



131 İNVAZİV DUKTAL KARSİNOM OLGUSUNDA, C-ERBB-2 ARTMIŞ EKSPRESYONUNUN, HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNHİSTOKİMYASAL PROGNOZİK FAKTÖRLERLE KARŞILAŞTIRILMASI

CORRELATION OF C-ERBB-2 OVEREXPRESSION WITH HISTOPATHOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PROGNOSTIC FACTORS IN 131 INVASIVE DUCTAL CARCINOMA CASES

¹Ebru ARABACI

¹Gülay BİLİR

¹Işın PAK

²Ali E. DEMİRBAĞ

¹Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü, ANKARA

²Yüksek İhtisas Hastanesi Gastroenteroloji Cerrahi Bölümü, ANKARA

Anahtar Sözcükler : meme kanseri, c-erbB-2 onkogeni, prognostik faktörler

Key Words : breast cancer, c-erbB-2 oncogene, prognostic factors

ÖZET

C-erbB-2 onkogeni, p185 olarak bilinen, epidermal büyüme faktörü ailesine ait, tirozin kinaz aktiviteli bir transmembran glikoproteinini kodlar. Meme kanserinde c-erbB-2' nin artmış ekspresyonu kötü prognozla ilişkilidir.

Bu çalışmada, 131 invaziv duktal karsinom vakasına ait parafin doku kesitleri incelendi. C-erbB-2 artmış ekspresyonu ile diğer prognostik belirleyiciler (yaş, tümör boyutu, lenf nodu tutulumu, tümör grade' i, lenfovasküler invazyon, nöral invazyon, ekstensif intraduktal karsinom, östrojen ve progesteron reseptör statüsü, p53) arasındaki ilişki değerlendirildi. Sonuçlarımız, c-erbB-2 artmış ekspresyonunun yaş ($p=0.02$), tümör grade' i ($p=0.001$), östrojen reseptörü ($p=0.017$), p53 ($p=0.047$) ile istatistiksel olarak ilişkili olduğunu gösterdi.

Bu çalışma, c-erbB-2 onkogeninin, meme kanserinde, diğer klinikopatolojik-moleküler faktörlerle ilişkili önemli bir biyolojik belirleyici olduğunu göstermiştir.

SUMMARY

C-erbB-2 oncogene, encodes a transmembran glycoprotein with tyrosine kinase activity known as p185, which belongs to the family of epidermal growth factors. Its overexpression in breast cancer has been correlated with poor prognosis.

In this study, paraffin-embedded tumor sections from 131 invasive ductal carcinoma cases were analyzed . The relationship between c-erbB-2 overexpression and other prognostic markers (age, tumor size, lymph node involvement, tumor grade, lymphovascular invasion, neural invasion, extensive intraductal carcinoma, estrogen, progesteron receptor status and p53) were examined. Our results showed that, c-erbB-2 overexpression is statistically correlated with age ($p=0.02$), tumor grade ($p=0.001$), estrogen receptor ($p=0.0017$) and p53 ($p=0.047$).

This study confirmed that c-erbB-2 oncogene, related to other clinicopathological-molecular factors, is an important biologic marker in breast cancer.

GİRİŞ

C-erbB-2 (Her-2/neu) geni, meme kanserinde genetik instabilitenin sık olduğu bir bölgede 17. kromozomda lokalize, p185 olarak tanımlanan, 1255 aminoasitlik, EGF (epidermal growth factor) reseptör ailesinin 4 üyesinden biri olan, kısaca HER-2 (c-erbB-2) proteini veya reseptörü olarak bilinen, bir transmembran glikoproteinini kodlayan onkogendir (1,2,3).

HER reseptörleri hücre membranında monomerler halinde bulunur, değişik dokularda mevcuttur ve benzer yapısal özelliklere sahiptir (2,4).

HER reseptörlerini aktive eden çok sayıda ligand tanımlanmış olmakla birlikte HER-2 reseptörü için bilinen bir ligand mevcut değildir ancak HER-2 diğer aile üyeleri için tercih edilen bir dimerizasyon partneridir. HER-2 heterodimerleri yüksek sinyal potansiyeline sahip, mitojenik indeks açısından potent dimerlerdir. Bu da HER-2 aşırı ekspresyonu gösteren tümörlerde izlenen yüksek büyüme hızı ve onkojenik potansiyeli açıklamada anahtar olabilecek bir faktördür (5,6,7).

Yazışma adresi: Ebru ARABACI, Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ANKARA

Makalenin geliş tarihi : 22.11.2004 ; kabul tarihi : 04.02.2005

Normal epitelial hücreler 2 kopya halinde HER-2 genine sahiptir ve hücre yüzeyinde düşük seviyelerde HER-2 proteini ekspresse ederler. Onkogenik transformasyon ile HER-2 gen amplifikasyonu artmış mRNA transkripsiyonuna yol açar ve hücre yüzeyinde HER-2 reseptör monomerleri artar (1,7). C-erbB-2 gen amplifikasyonu ilk kez insan meme kansinomlarında daha sonra da over kansinomlarında tesbit edilmiştir (2).

Meme kansinomlarında %20-40 arasında değişen oranlarda c-erbB-2 artmış ekspresyonu ve amplifikasyonu bildirilmektedir (8,9,10). Meme kanserinde c-erbB-2 protein aşırı ekspresyonu gösteren vakaların %92' si HER-2 gen amplifikasyonu sonucu oluşmaktadır (11). C-erbB-2 onkogeni, gen amplifikasyonu, gen transkripsiyonu veya gen ürün ekspresyonu seviyelerinde, farklı metodlarla incelenebilir. En çok kullanılan iki yöntem immünohistokimya ve flöresan in situ hibridizasyondur (12,13). C-erbB-2 reseptörüne yönlendirilmiş, humanize monoklonal bir antikör olan herceptin (Trastuzumab)' in FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanarak kullanıma başlamasından sonra c-erbB-2 durumunun doğru, yeterli ve güvenilir tesbiti daha da önem kazanmıştır (14). ASCO (American Society of Clinical Oncology) tümör marker paneli , Herceptin için prediktif faktör olarak kullanılmak üzere, c-erbB-2' nin, tüm primer meme kansinomlarında tanı ve rekürrens anında incelenmesini önermektedir (15).

Preklinik çalışmalar, c-erbB-2 anomalilerinin daha malign bir fenotip ile sonuçlandığını göstermiştir (16). Preklinik sonuçlarla uyumlu olarak çok sayıda klinik çalışma da anormal c-erbB-2 gösteren meme kanserlerinin daha kötü prognoza sahip olduğunu ortaya koymuştur (2,17). C-erbB-2 gen amplifikasyonu ve/veya aşırı ekspresyonunun, meme kanserindeki diğer prognostik faktörlerle ilişkisi ile ilgili de çok sayıda çalışma yayınlanmış ancak bu çalışmalarda tartışmalı sonuçlar elde edilmiştir (18,19,20).

Çalışmamızda memenin invaziv duktal kansinomunda c-erbB-2 ekspresyonu ile tümör davranışını belirleyen prognostik faktörler olan, yaş, tümör boyutu, grade, lenf nodu tutulumu, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon, ekstensif intraduktal kansinom , östrojen ve progesteron reseptör durumu, p53 ekspresyonu arasındaki ilişki incelenmiştir.

MATERYAL VE METOD

Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü arşivinde, Ocak 2001- Nisan 2003 tarihleri arasında kayıtlı, meme kansinomu nedeniyle mastektomi uygulanmış, 131 olguya ait materyal çalışma grubuna alınmıştır. Mastektomi materyalinde rezidüel tümörü olmayan olgularda biyopsi materyalleri bölümümüz tarafından incelenmiş olanlar çalışmada kullanılmıştır. Tüm olgularda primer tümör tanısı invaziv duktal kansinomdur.

Olgulara ait yaş, tümör boyutu, lenf nodu durumu, östrojen ve progesteron reseptörleri ile c-erbB-2 ve p53' e ait immünohistokimyasal durum ve histopatolojik parametre bilgileri, retrospektif olarak patoloji raporlarından ve hasta dosyalarından elde edilmiştir. 2001-2003 tarihleri arasında mastektomi materyalleri %10' luk formaldehitde tesbit edildikten sonra, rutin doku takibi sonrası, parafine bloklanmıştır. Parafin doku bloklarından yapılan 5 mikron kalınlıktaki histolojik kesitler hematoksilin-eosin ile boyanmıştır.

Olgulara, avidin- biotin kompleks immünperoksidaz yöntemi ile östrojen reseptörü (Neomarkers, clone ID5+6FII, 1/50), progesteron reseptörü (Neomarkers, Clone hPRa2+hPRa3, 1/250), c-erbB-2 (Neomarkers, Clone e2-4001+3b5, 1/250) ve p53 (Neomarkers, clone DO-7+BP53-12,1/250) uygulanmıştır. Östrojen ve progesteron reseptörü için, tümör hücrelerinin %10' undan fazlasında, p53 için %5' inden fazlasında nükleer boyanma pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (21). C-erbB-2 artmış ekspresyon durumu ise, eğer tümör hücrelerinin hiçbirinde boyanma yok veya %10' undan azında membran boyanması var ise 0, tümör hücrelerinin %10' undan fazlasında, membranın sadece bir kısmında, hafif/zor seçilebilir membran boyanması var ise 1+, tümör hücrelerinin %10' undan fazlasında, zayıf-orta komplet membran boyanması var ise 2+, tümör hücrelerinin %10' undan fazlasında güçlü komplet membran boyanması var ise 3+ olarak derecelendirilmiştir. Bu sisteme göre 0 ve 1+ olan vakalar negatif, 2+ ve 3+ olan vakalar ise pozitif olarak değerlendirilmiştir (22).

Elde edilen veriler kodlanarak SPSS for Windows 10.0.1 ortamında bilgisayara kaydedilmiştir. Değişkenler sayı ve yüzde olarak düz tablolarda gösterilmiş, çapraz tablolarda 'chi-square' ve ' Fisher' s exact test', ikili grup ortalamalarını karşılaştırırken parametrik verilerde student t testi kullanılmıştır. Bütün testlerde p< 0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Hastaların yaş ortalaması 50.70 ± 12.78 ' dir. En genç hasta 25, en yaşlı hasta ise 78 yaşındadır. Olguların hepsi kadın hastalardır. Olgulara ait parametrelerin dağılımı tablo 1' de gösterilmiştir. Çalışmamızda, yaş ile c-erbB-2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu görülmüştür (p<0.05) (Tablo 2). Artan yaş ile birlikte c-erbB-2 ekspresyonu da artmaktadır. Ancak c-erbB-2 pozitif ve negatif bireylerin yaş ortalaması arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (t=0.534 p=0.594). Tümör boyutu ile c-erbB-2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır (p>0.05). Olgularımızın %68.7' sinde aksillada lenf nodu metastazı vardır.

Tablo 1. Olguların incelenen parametrelere göre dağılımı

	Olgu Sayısı	Yüzde (%)
Yaş		
<35	10	7,6
35-50	64	48,9
>50	57	3,5
Tümör Boyutu		
≤ 5 cm	68	51,9
> 5 cm	63	48,1
Lenf nodu Merastazı		
Yok	41	31,3
1-3	25	19,1
>3	65	49,6
Grade		
I	15	11,5
II	51	38,9
III	65	49,6
Lenfovasküler invazyon		
Var	45	34,4
Yok	86	65,6
Perinöral invazyon		
Var	12	9,2
Yok	119	90,8
Ekstensif intraduktal karsinom		
Var	11	9,2
Yok	120	91,6
Östrojen Reseptörü		
Pozitif	81	61,8
Negatif	50	38,2
Progesteron Reseptörü		
Pozitif	82	62,6
Negatif	49	37,4
P53		
Pozitif	63	48,1
Negatif	68	51,9
C-erbB-2		
0 (negatif)	34	26
1+ (negatif)	17	13
2+ (pozitif)	44	33,6
3+ (pozitif)	36	27,4

Metastatik lenf nodu sayısı arttıkça, c-erbB-2 ekspresyonu artma eğilimi göstermektedir. Ancak lenf nodu metastazı ve c-erbB-2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki mevcut değildir ($p > 0.05$) (Tablo 2).

Histolojik grade olgularımızın çoğunda (%49.6) 3' dür ve grade arttıkça c-erbB-2 ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede artmaktadır ($p < 0.05$) (Tablo 1 ve 2).

Çalışmamızda c-erbB-2 ekspresyonu ile lenfovasküler invazyon ($p=0.567$), perinöral invazyon ($p=0.536$) ve ekstensif intraduktal karsinom ($p=0.750$) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamıştır (Tablo 2).

Olgularımızda, östrojen reseptör pozitifliği arttıkça c-erbB-2 ekspresyonu azalmakta, p53 pozitifliği arttıkça c-erbB-2 ekspresyonu artmaktadır ve bu ilişkiler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$) (Tablo 2). Progesteron reseptörü ile c-erbB-2 ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunamamıştır (Tablo 2).

Tablo 2. C-erbB-2 ekspresyonu ve prognostik parametrelerin karşılaştırılması

	C-erbB-2 Ekspresyonu				P
	Negatif		Pozitif		
	n	%	n	%	
Yaş					
<35	-	-	10	12,5	0,02
35-50	31	60,8	33	41,3	
>50	20	39,2	37	46,3	
Tümör Boyutu					
< 5 cm	25	49	43	53,8	0,650
> 5 cm	26	51	37	46,3	
Lenf Nodu					
Yok	20	39,2	21	26,3	0,283
1-3	8	15,7	17	21,3	
>3	23	45,1	42	52,5	
Grade					
I	12	23,5	3	3,8	0,001
II	21	41,2	30	37,5	
III	18	35,3	47	58,8	
ER					
Pozitif	38	74,5	43	58,8	0,017
Negatif	13	25,5	37	46,3	
PR					
Pozitif	37	72,5	45	56,3	0,060
Negatif	14	27,5	35	43,8	
P53					
Pozitif	19	37,3	44	55	0,047
Negatif	32	62,7	36	45	

TARTIŞMA

Meme karsinomlarında , c-erbB-2 gen amplifikasyonu ve prognoz arasındaki ilişkiyi gösteren ilk çalışmada Slamon ve arkadaşları, southern-blot tekniği ile tesbit ettikleri c-erbB-2 onkogen amplifikasyonunun, tümör boyutu, östrojen ve progesteron reseptör statüsü ve yaş ile korele olmadığını ancak lenf nodu metastazı olan hastalarda bağımsız prognostik önemi olduğunu göstermiştir (8). Borg ve arkadaşlarının çalışmasında ise, 539 invaziv primer meme karsinomunda , büyük tümör boyutu, pozitif lenf nodu durumu, ileri evre ve steroid reseptör yokluğu ile c-erbB-2 artmış ekspresyonu arasındaki korelasyon gösterilmiştir (20).

Bizim olgularımızda tümör boyutu ve lenf nodu statüsü ile c-erbB-2 ekspresyonu arasında istatistiksel ilişki saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 2). Ancak metastatik lenf nodu sayısı arttıkça c-erbB-2 ekspresyonu artma eğilimi gösteriyordu. Bu bulgu, metastatik lenf nodu sayısı arttıkça, bir anlamda hastalık ilerledikçe, c-erbB-2 ekspresyonunun arttığını ancak bu iki parametrenin birbirinden bağımsız prognostik faktörler olduğunu göstermektedir.

Çalışmalarında, lenf nodu durumu ve tümör boyutu ile c-erbB-2 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki gösteremeyen Marx ve arkadaşları, yüksek grade' li tümörlerde, c-erbB-2 ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fazla olduğunu bulmuşlardır (23). Bizim çalışmamızda olguların %49.6' sı histolojik grade 3' dür (Tablo 1). Olgularımızda, literatür ile uyumlu olarak, histolojik grade arttıkça, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde c-erbB-2 ekspresyonu-

nun arttığı görülmüştür ($p < 0.05$) (tablo 2). Bu da agresif fenotipli tümörlerde c-erbB-2 ekspresyonunun daha fazla sıklıkta görüldüğünü düşündürmektedir. Çok sayıda çalışmada, steroid reseptörleri ve c-erbB-2 arasında kuvvetli ters ilişki bulunmuştur (23,24). Buna neden olarak da bazı araştırmacılar, c-erbB-2 ligandları olan, heregulin ve gp-30' un östrojen reseptör aktivitesini bloke ettiğini söylerken (25), bazıları bu durumu östrojen reseptörü DNA' sındaki mutasyonlara bağlamış (26), bazıları da c-erbB-2' nin kötü prognozlu tümörlerde var olması ile açıklamışlardır (19). Çok sayıda araştırmacı ise, c-erbB-2 ekspresyonu ile steroid reseptörleri arasında ilişki gösterememiştir (19,27,28). Bizim olgularımızda ise, c-erbB-2 ekspresyonu ile östrojen reseptörü arasında istatistiksel olarak anlamlı ters ilişki gösterilmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 2). Ancak progesteron reseptör pozitifliği arttıkça c-erbB-2 ekspresyonu negatif olma eğilimi göstermekle birlikte, bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 2). Çalışmamızda, çok sayıda araştırmacının bulguları ile uyumlu olarak, c-erbB-2 ekspresyonu ile p53 arasında, istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon görülmüştür (29,30,31) (tablo 2).

İnvaziv meme karsinomlarında, intraduktal yayılım, lenfovasküler invazyon ve perinöral invazyon ile c-erbB-2 ekspresyonu arasındaki ilişki ile ilgili literatürde az sayıda çalışma vardır. Jing ve arkadaşları invaziv meme karsinomlarında, intraduktal yayılım ile c-erbB-2 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon göstermişlerdir (31).

KAYNAKLAR

1. Dawkins HJS, Robbins PD, Smith KL, et al. What's new in breast cancer? Molecular perspectives of cancer development and the role of the oncogene c-erb-2 in prognosis and disease Path. Res. Pract. 1993; 189: 1233-1252.
2. Yosef Yarden. Biology of HER2 and its importance in breast cancer, Oncology 2001; 61(suppl 2):1-13.
3. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, et al. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: Biomarker and Target of therapy. The Oncologist 2003;8(4):307-325.
4. Rubin I, Y. Yarden. The basic biology of HER2, Symposium Article. Annals of Oncology, 2001; 2:127-137.
5. Caroline Lohrisch, Martine Piccard. An overview of HER-2. Seminars in Oncology 2001;28(no 6 suppl 18): 3-11.
6. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. Experimental Cell Research 2003; 284:99-110.
7. Dowsett M, Cooke T, Ellis I, et al. Assessment of HER 2 status in breast cancer: why, when and how?. European Journal of Cancer 2000;36:170-176.
8. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2 neu oncogene. Science 1987; 235:177-182.
9. Daniel F. Hayes, Ann D. Thor. C-erbB-2 in breast cancer: Development of a clinically useful marker, Seminars in Oncology, 2002;29(3): 231-245.
10. Pietras R, Arboleda J, Reese D, et al. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone – independent growth in human breast cancer cells. Oncogene 1995; 10: 2435- 2446.
11. Pauletti G, Godolphin W, Slamon DJ et al.: detection and quantitation of HER- 2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. Oncogene 1996; 13:63-72.
12. Wedad Hanna. Testing for HER-2 status . Oncology 2001; 61(suppl 2); 22-30.
13. Larsimont D, Leo A, Rouas G, et al. HER-2/neu evaluation by immunohistochemistry and fluorescence in situ hibridization in breast cancer: Implications for daily laboratory practice. Anticancer Research 2002;22:2485-2490.
14. Vijver M. Emerging technologies for HER-2 testing. Oncology 2002; 63 (suppl 1): 33-38.
15. Isaacs C, Stearns V, Hayes D. New prognostic factors for breast cancer recurrence. Seminars in Oncology 2001;28:53-67.

Rilke ve arkadaşları gen amplifikasyonu ile lenf nodu metastazı arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulamamış ancak amplifikasyon ve lenfovasküler invazyon arasında anlamlı ilişki saptamışlardır (32). Bizim çalışmamızda ise, c-erbB-2 ekspresyonu ile, ekstensif intraduktal karsinom, lenfovasküler invazyon ve perinöral invazyon arasında, istatistiksel anlamlı ilişki görülememiştir ($p > 0.05$).

Çalışma grubumuzu oluşturan olgularda, artan yaş ile birlikte c-erbB-2 ekspresyonunun da arttığı görülmektedir (tablo 2). 50 yaş üzeri hastalarda, diğer yaş gruplarına göre, c-erbB-2 ekspresyonu yüksek oranda izlenmiştir. Ancak c-erbB-2 negatif ve pozitif bireylerin yaş ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p > 0.05$). 650 hastada, c-erbB-2 ekspresyonu ve amplifikasyonunu inceleyen Jukkola ve arkadaşlarının çalışmasında da c-erbB-2 pozitifliği postmenopozal kadınlarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fazla bulunmuştur. 36 aylık takiplerde, bu gruptaki hastaların, en kısa sağkalım sürelerine sahip oldukları görülmüştür (24).

Çalışmamızda elde edilen veriler sonucunda, c-erbB-2' nin meme karsinomunda önemli prognostik parametreler olan, tümör grade' i, östrojen reseptör durumu, p53 ekspresyonu ve yaş ile ilişkili, ancak lenf nodu metastazı, tümör çapı, progesteron reseptör durumu, lenfovasküler-perinöral invazyon, ve ekstensif intraduktal karsinom varlığı ile ilişkisiz, önemli bir biyolojik parametre olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

16. N.J.Bundred. Prognostic and Predictive Factors in Breast cancer. *Cancer Treatment Reviews* 2001; 27: 137-142.
17. RLH. Jansen. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Netherlands Journal of Medicine* 1997; 51:65-77.
18. Stamatina Kaptain, Lee K. Tan, Beiyun Chen. Her-2/neu and Breast cancer. *Diagnostic Molecular Pathology* 2001;10(3): 139-152.
19. Tervahauta A, Eskelinen M, Syrjanen S, et al. Immunohistochemical demonstration of c-erbB-2 oncoprotein expression in female breast cancer and its prognostic significance. *Anticancer Res.* 1991;11: 1677-1682.
20. Borg A, Baldetorp B, Fernö M, et al. ERBB2 amplification in breast cancer with high rate of proliferation. *Oncogene* 1991; 6: 137-143.
21. Tavassoli FA. *Pathology of the Breast*. 2nd. Ed., Hong Kong: Mc Graw-Hill Company, 1999.
22. Juan Rosai. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. Ninth Ed. Vol. 2, Mosby. 2004.
23. Marx D, Schauer A, Reiche C, et al. C-erbB-2 expression in correlation to other biological parameters of breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990; 116: 15-20.
24. Jukkola A, Bloigu R, Soini Y et al. C-erbB-2 positivity is a factor for poor prognosis in breast cancer and poor response to hormonal or chemotherapy treatment in advanced disease. *European Journal of Cancer* 2001; 37: 347-354.
25. Saceda M, Grunt TW, Colomer R, et al. Regulation of estrogen receptor concentration and activity by an erB/HER ligand in breast carcinoma cell lines. *Endocrinology* 1996; 137: 4322-4330.
26. Fuqya SA, Fitzgerald SD, Allred DC. Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors. *Cancer Res.* 1992;52:483-486.
27. Querzoli P, Marchetti E, Fabris G, et al. Immunohistochemical expression of c-erbB-2 in human breast cancer by monoclonal antibody: correlation with lymph node and ER status. *Tumori* 1990; 76: 461-464.
28. Barbati A, Cosmi EV, Sidoni A, et al. Value of c-erbB-2 and p53 oncoprotein co-overexpression in human breast cancer. *Anticancer Res.* 1997; 17: 401-406.
29. Barbereshi M, Leonardi E, Mauri F, et al. P53 and c-erbB-2 protein expression in breast carcinomas. An immunohistochemical study including correlations with receptor status, proliferation markers, and clinicalstage in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 408-418.
30. Beenken SW, Grizzle WE, Crowe RD, et al. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erbB-2 and p53. *Annals of Surgery* 2001; 233(5):630-638.
31. Jing X, Kakudo K, Murakami M, et al. Intraduktal spread of invasive breast carcinoma has a positive correlation with c-erbB-2 overexpression and vascular invasion *Cancer* 1999; 86(3):439-448
32. Rilke F, Colgagni MI, Cascinelli N et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J Cancer* 1991; 49: 44-49.